

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年12 月19 日 (19.12.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/101040 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/09, C07K 16/14,  
7/06, 7/08, C12P 21/08, G01N 33/53

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/05783

(22) 国際出願日: 2002 年6 月11 日 (11.06.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2001-177640 2001 年6 月12 日 (12.06.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財  
団法人化学及血清療法研究所 (JURIDICAL FOUN-  
DATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RE-  
SEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒860-8568 熊本県 熊  
本市 大窪一丁目 6 番 1 号 Kumamoto (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中島 敏博

(NAKASHIMA, Toshihiro) [JP/JP]; 〒869-1298 熊本県  
菊池郡 旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4-1 財団法人化  
学及血清療法研究所 菊池研究所内 Kumamoto (JP). 湯  
口 正人 (YUGUCHI, Masato) [JP/JP]; 〒869-1298 熊本  
県 菊池郡 旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4-1 財団法人  
化学及血清療法研究所 菊池研究所内 Kumamoto (JP).

(74) 代理人: 青山 葆, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.); 〒  
540-0001 大阪府 大阪市 中央区城見 1 丁目 3 番 7 号  
IMP ビル 青山特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AU, CA, JP, KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,  
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: HUMAN-TYPE ANTI-BLOOD COAGULATION FACTOR VIII ANTIBODY

(54) 発明の名称: ヒト型抗血液凝固第VIII因子抗体

(57) Abstract: A human-type anti-blood coagulation factor VIII (hereinafter referred to as FVIII) which binds to human FVIII and specifically inhibits the blood coagulation activity thereof, and its antibody fragment. An scFv display phage library, which has been constructed by using scFv DNA on the basis of random combinations of the VH chain gene and VL chain gene of immunoglobulin originating in lymphocytes of a patient with hemophilia A, is reacted with FVIII having been immobilized on a solid phase via an anti-FVIII monoclonal antibody. Then scFv clones capable of binding to FVIII are screened to thereby clarify antibody VH chain and VL chain specific to FVIII.

(57) 要約:

ヒト血液凝固第VIII因子 (以下、FVIIIと称することもある) に結合し、特異的にその血液凝固活性を阻害するヒト型抗FVIIIインヒビター抗体及び抗体フラグメントを提供する。血友病A患者リンパ球由来の免疫グロブリンのVH鎖遺伝子とVL鎖遺伝子のランダムな組み合わせによるscFv DNAを用いて作製されたscFvディスプレイファージライブラリーを、抗FVIIIモノクローナル抗体を介して固相に固定化されたFVIIIと反応させて、FVIIIと結合可能なscFvクローンをスクリーニングし、FVIIIに特異的な抗体VH鎖及びVL鎖を明らかにする。



WO 02/101040 A1

## 明 細 書

## ヒト型抗血液凝固第VIII因子抗体

## 技術分野

本発明は、ヒト血液凝固第VIII因子（以下、FVIIIと称することもある）に結合し、特異的にその血液凝固活性を阻害するヒト型抗FVIIIインヒビター抗体及び抗体フラグメントの提供に関する。

## 背景技術

血友病Aは、FVIIIの異常または欠失により血液の凝固作用が弱まった結果、内臓や関節等に出血を起こす遺伝性疾患である。血友病Aの患者の治療にはFVIIIの補充療法が行われるが、補充療法を受けた患者のうちのおよそ10%（8～15%）ぐらいにFVIIIに対する抗体の出現が観察される。この抗体は抗FVIIIインヒビター抗体と呼ばれ、凝固因子補充療法を無効にし、血友病患者の止血管理を著しく困難にする。

これらの抗FVIIIインヒビター抗体の性状と産生機構を明らかにすることは、インヒビター抗体産生抑制、制御を可能にすると考えられる。これまで抗FVIIIインヒビター抗体が出現した血友病患者の血清より精製した抗FVIIIインヒビター抗体（ポリクローナル抗体）やマウス抗FVIIIインヒビター抗体（マウスモノクローナル抗体）を用いた研究により、多くの知見が得られているが、患者由来の抗FVIIIインヒビター抗体のクローニングはこれまで殆ど報告されていない。

一方、疫学的な調査から、血友病患者は心筋梗塞などの動脈硬化症の発症率が低い（特に致死的な心筋梗塞発症率が有意に低い）こと（Br. J. Haematol. 1990, 75, 525-530、Lancet 1995, 345(8943) 152-155）、血漿中のFVIIIの増加が動脈梗塞症や動脈硬化のリスクファクターとなる（Semin. Hematol. 1997, 34, 171-187、Thromb. Res. 1997, 84, 359-362）ことが明らかにされており、抗FVIIIインヒビター抗体等を用いて低凝固状態の保持ができれば動脈梗塞症や動脈硬化の予防及び治療に寄与する事が期待される。特に、フォンビルブランド因子（以下、vWFと称することもある）と解離した活性化FVIIIを特異的に認識できる抗FVIII抗体は、通常血中にvWFと結合した状態で存在するFVIIIと複合体を形成しないため血中クリアランスが長く、1回の投与で長期間低凝固状

態を維持でき、かつ出血傾向や他の副作用の少ない優れた抗血栓治療薬として使用することができる。

既に我々を含め多数の施設でマウスモノクローナル抗体の作製が試みられ、多くのFVIIIに対するモノクローナル抗体が生み出されている。それらの内のいくつかはFVIIIの活性を阻害し、抗FVIIIインヒビター抗体として振る舞うことが確認されている。これらのマウスモノクローナル抗体を用いてFVIIIの活性阻害領域の解析等多くの成果が得られてきた。

### 発明の開示

(発明が解決しようとする技術的課題)

しかし、完全ヒト型の抗FVIIIインヒビター抗体の作製は、多数の施設で、抗FVIIIインヒビター抗体保有患者のリンパ球を用いてハイブリドーマ法（ヒトマウス、ヒトヒトハイブリドーマ法）やEBトランスフォーム法を用いて10年以上に渡り検討が行われてきたが困難を究めてきた。

1998年になって、Marc G. Jacquemin等がEBトランスフォーム法を用いて初めてその確立を報告した（Blood, 92(2), 1998, 496-506）。彼らが確立したBO2C11抗体はFVIIIとvWFやリン脂質との結合を阻害し、FVIIIのC2ドメインを認識すると考えられ、その抗体はDP5フラグメント由来のVHとVκ3由来のVLであった。彼らはまた同様の方法でC1ドメインに対する抗FVIIIインヒビター抗体産生クローンの確立にも成功し、その抗体がDP64とVκ3由来であることを報告した（Blood, 95, 2000, 156-163）。ハイブリドーマ法（ヒトマウス、ヒトヒトハイブリドーマ法）やEBトランスフォーム法でこの様なヒト由来抗FVIIIインヒビター抗体産生クローンを確立しているのは現在、Marc G. Jacquemin等のグループのみである。

一方、J. D. Marks等が報告したファージ抗体法（J. Mol. Biol, 222, 581-597, 1991）は、従来のハイブリドーマ法やEBトランスフォーム法に比べ、患者のリンパ球由来の抗体レパトアを短期間にしかも多くのクローンをスクリーニングできる利点を有している。近年になってこのファージ抗体法によるインヒビター抗体単離のアプローチも試みられてきた。1995年6月の国際血栓止血学会（イスラエル）（1995, ISTH）においてW. H. Ouehandらは、健常人由来ヒト

型ファージ抗体ライブラリー及び合成ヒト型ファージ抗体ライブラリーからヒト型抗血液凝固第VIII因子一本鎖抗体 (s c F v) をクローニングしたことを、また、1997年6月の国際血栓止血学会においてJ. Davisらは、VHのみ血友病患者由来で、VLは健常人由来であるヒト型ファージ抗体ライブラリーからヒト型抗血液凝固第VIII因子一本鎖抗体 (s c F v) をクローニングしたことを報告している。しかし、これらは合成や半合成でヒト型ファージ抗体ライブラリーを構築しており、VH、VLとも完全に血友病患者由来ではない。更に、これらの報告で得られたクローンはELISAによりFVIIIへの結合性は有しているが、FVIIIの凝固活性を阻害することは確認されていない。更に2000年には、E. N. van den Brink等が、VL鎖が正常人由来、VH鎖がインヒビター保有患者由来のファージ抗体ライブラリーを構築し、4種のFVIII反応性のクローンを分離し、2種がFVIIIのC2ドメインを、2種がA2ドメインと反応性を有することを報告している (van Den Brink Human antibodies with specificity for the C2 domain of factor VIII are derived from VH1 germline genes (Blood. 2000; 95:558-563)、Molecular analysis of human anti-factor VIII antibodies by V gene phage display identifies a new epitope in the acidic region following the A2 domain (Blood. 2000; 96:540-545))。

C2ドメインは、vWFとの結合やリン脂質との結合に関与し、患者血中の多くの抗FVIIIインヒビター抗体の主要な認識領域であることが報告されている

(Healey, J. F. 等、Residues Glu2181-Val2243 contain a major determinant of the inhibitory epitope in the C2 domain of human factor VIII, Blood, 1998, 92, 3701-3709)。

van den Brink等の研究では、C2ドメインに対する抗体フラグメントが得られているが、その抗体フラグメントはFVIIIの阻害活性を有さなかった。従って、ファージ抗体法を用いて、インヒビター活性を有するヒト型抗FVIII抗体の分離にはいまだ成功例がなく、十分な知見が得られていない状況である。

(その解決方法)

従来、ファージ抗体法を用いてインヒビター活性を有するヒト型抗FVIII抗体の分離ができなかったのは、抗体フラグメントのVL鎖を患者由来のものをを用い

ていないことや、スクリーニング方法に課題があるためと推定された。

発明者等はこれらの問題を鋭意研究、解決の結果、FVIIIに対して明らかな特異性と阻害活性を有する新規な抗FVIIIインヒビター抗体を患者リンパ球よりファージ抗体法を用いて分離することに成功し、その特異的な抗体VH鎖及びVL鎖を明らかにした。

#### 図面の簡単な説明

図1は、抗ヒトFVIII A2マウスモノクローナル抗体を固定化したELISAプレートと得られたscFvクローンを組み合わせたELISAによるヒトFVIIIの測定例を示す。

図2は、3種の抗ヒトFVIII精製scFvを用いたテストチームFVIIIの測定例を示す。

図3は、ヒトFVIIIにvWFを含まないFVIIIとマルチマーのvWFを含む精製FVIII製剤を用いた場合の部分活性化トロンボプラスチン時間（APTT）測定による精製scFvを用いた場合のFVIII残存活性の評価結果を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

ヒト抗FVIIIインヒビター抗体の可変（V）領域に関する情報を得るために、まず本発明者らは、抗FVIIIインヒビター抗体を有する血友病A患者の末梢血Bリンパ球より、RT-PCR法にて、免疫グロブリン重鎖、軽鎖cDNAを増幅、更に両者をlinker DNAで結合し、患者リンパ球由来のVH鎖とVL鎖のランダムな組み合わせによる一本鎖Fv（scFv）DNAを作製した。

このscFv DNAをphagemid vector pCANTAB5Eに組込み、 $10^7$ クローンからなる血友病A患者由来のscFvディスプレイファージライブラリーを作製した。このライブラリーを、抗FVIIIモノクローナル抗体を介して固相に固定化されたFVIIIと反応させて、FVIIIと結合可能な抗FVIII-scFvディスプレイファージクローンをスクリーニングした。

当該抗FVIIIモノクローナル抗体は、定法により作製されるもので、マウスモノクローナル抗体が使用される。また、当該抗FVIIIモノクローナル抗体は、このましくはFVIIIのA2領域もしくは活性化FVIIIのL鎖の立体構造依存性エпитープを認識する抗体であることが好ましい。このような抗体を使用することに

より、FVIIIを立体構造に大きな変化を与えることなく固相化担体上に保持することが可能となる。従って、このスクリーニング系では各々の抗FVIIIマウスモノクローナル抗体が認識するエピトープ以外を認識する抗FVIII-s c F vを呈示したファージクローンが得られることになる。

- 5       また、当該モノクローナル抗体をビオチンで標識し、更に固相としてアビジン固定化磁性粒子を使用することにより、ヒトFVIIIと結合可能な抗FVIII-s c F vディスプレイファージクローンを容易に回収することができる。

      ビオチン化した抗FVIIIマウスモノクローナル抗体を用いることにより、精製したFVIIIを必要とせず、また微量のFVIIIでスクリーニングを行うことが可能となる。

- 10       スクリーニングの結果、7種類の抗FVIII結合能を有するs c F vクローンが分離され、その内、3種がFVIII凝固活性を阻害した。得られた3種のクローンのVH遺伝子はいずれもVH1ファミリーのDP-5 (1-24)由来、VL遺伝子はVκ1ファミリーのDPK9 (012/02)由来であった。他の4種のクローンのVH  
15       はVH1ファミリーのDP-88或いは4M28由来、VLはDPK22、Vg、DPK9、IGLV6S1由来であり、阻害活性を有するクローンと異なっていた。FVIII凝固活性を有するクローンのVHはMarc G. Jacquemin等と同様のDP-5セグメント由来であったが、VHのCDR3の配列は大きく異なっていた。また、これらのクローンのVL鎖のCDR3配列内のセリンもしくはスレオニンのグルタミンへの変異で、これらのクローンのFVIII結合活性が殆ど消失することことから、これらのクローンのFVIIIへの結合にはVL鎖のCDR3が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

- 得られた3種のクローン (YK3.3.38、YK3.3.40、YK3.3.50) のVH鎖及びVL鎖の塩基配列並びにアミノ酸配列を配列表に示した。YK3.3.38のVH鎖及びVL鎖を配列番号1～2及び配列番号3～4に、YK3.3.40のVH鎖及びVL鎖を配列  
25       番号5～6及び配列番号7～8に、YK3.3.50のVH鎖及びVL鎖を配列番号9～10及び配列番号11～12にそれぞれ示した。

      更に、当該配列中、VH鎖及びVL鎖のCDR1からCDR3のアミノ酸配列を配列番号13から18に示した。なお、CDR1、2、3の定義はKabatの分

類による (E. A. Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th ed., U.S. Department of Health and Human Services, Washington DC (1987))。

[VH鎖]

5 CDR 1 : Glu Leu Ser Ile His <配列番号 1 3>

CDR 2 : Gly Leu Asp Arg Glu Asp Gly Lys Xaa Val Ser Ala Gln Arg Phe  
Gln Gly (Xaa : ThrまたはAla) <配列番号 1 4>

CDR 3 : Gly Val Ala Ser Asp Asp Asp Ala Phe Glu Ile <配列番号 1 5>

[VL鎖]

10 CDR 1 : Arg Ala Ser Gln Ser Ile Xa1 Xa2 Tyr Leu Asn (Xa1 : Serまたは  
Thr ; Xa2 : SerまたはArg) <配列番号 1 6>

CDR 2 : Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser <配列番号 1 7>

CDR 3 : Gln Xa1 Ser Tyr Xa2 Thr Pro Xa3 Thr (Xa1 : GlnまたはHis ; Xa2 :  
SerまたはThr ; Xa3 : LeuまたはIle) <配列番号 1 8>

15 上述した配列番号 1～2 及び 3～4、5～6 及び 7～8、9～10 及び 11～  
12 に記載の塩基配列及びアミノ酸配列は、ヒト FVIII の凝固活性に対して阻害  
活性を有するヒト抗 FVIII インヒビター抗体の V 領域の重鎖 (VH 鎖) 及び軽鎖  
(VL 鎖) に相当するものである。

本発明で開示される VH 鎖及び／または VL 鎖は、ファージ抗体法を用いて s  
20 c F v の形で得られた物であるが、原則としてその適用は s c F v に限定される  
ことはなく、開示した VH 鎖及び／または VL 鎖をヒト免疫グロブリンの定常部  
と連結した完全分子型、またヒト免疫グロブリンの定常部の一部と組み合わせた  
F a b、F a b' または F (a b')<sub>2</sub>、更に、s c F v をヒト免疫グロブリンの定  
常部と結合させた一本鎖抗体 (s c A b) などの他の抗体フラグメントもその適  
25 用範囲に含まれる。

また、これらの抗体及び抗体フラグメント蛋白分子に高分子修飾剤を結合させ  
た修飾蛋白分子も同様である。

また、本発明により得られる抗体フラグメントの性状解析の結果、その認識す  
る FVIII のエピトープは FVIII を SDS 処理することによって消失した。更に、

これらの抗体フラグメントが結合したFVIIIはリン脂質やvWFと結合できなかった。従って、これらの抗体フラグメントは血中に流れているvWFと結合したFVIIIには結合せず、vWFから解離して活性化型となったFVIIIとのみ結合する特性を有している。

- 5       これらの抗体フラグメントは、患者プラズマ由来のインヒビター抗体と競合する。従って、これらの抗体フラグメントは患者のインヒビター抗体と同一エピトープ、C2ドメインの構造依存的なエピトープを認識し、同一の性状を有すると推定される。

10       更にこれらの抗体フラグメントのFVIII阻害活性は、6700～29100ベセスダユニット/mgと非常に強力であった。

(従来技術より有効な効果)

15       以上より、本発明のヒト型モノクローナル抗体及び抗体フラグメント分子は、FVIIIの凝固活性を強力に阻害することができ、血栓症の予防及び治療のための薬剤として使用することができる。特に本発明のヒト型モノクローナル抗体及び抗体フラグメント分子はFVIII-vWF複合体を認識せず、フォンビルブラント因子に結合していない活性化したFVIIIのみを認識することができるので、通常血中に存在するFVIII-vWF複合体に反応することなく、活性化したFVIIIとのみ反応することが可能になる。

20       このことは血中半減期が非常に長く、出血傾向という副作用を起こしにくい他の抗血栓剤にない優れた効果が期待できる上、APTT測定などにより効果をモニターできる優れた新規抗血栓剤となることを示している。

25       また、本発明のヒト型モノクローナル抗体及び抗体フラグメント分子はその特性から、別のエピトープ（抗原決定基）を認識する抗FVIII抗体を組み合わせることで血中のvWFと解離した活性型FVIIIのレベルを測定する免疫学的測定法を提供する事が可能である。

      また、本発明のヒト型モノクローナル抗体及び抗体フラグメント分子を免疫学的に不活性な吸着物質からなる免疫吸着物質と吸着させた複合体は多くの応用が可能になる。

      まず第一にはヒト血漿または血清中に存在する微量のFVIIIをイムノアフィニ



ティクロマトグラフィにより精製することができる。更に、遺伝子組換え法により形質転換された培養細胞から産生される培養上清中のFVIIIの精製に用いることが可能である。

5 第二に、ヒト血漿または血清中またはヒト免疫グロブリン画分あるいは製剤中からヒト型モノクローナル抗体及び抗体フラグメント分子を用いたイムノアフィニティクロマトグラフィにより、本抗体の可変領域に対する抗イディオタイプ抗体を精製することが可能になる。このことは、本抗体と同様の性状のインヒビター抗体を有する患者の治療に新たな選択肢を提供するものである。

10 即ち、FVIII製剤投与前或いは同時にこれらの抗イディオタイプ抗体を患者に連続的に投与すること或いは抗イディオタイプ抗体を用いた免疫吸着法によりインヒビター抗体を除去することにより、抗FVIIIインヒビター抗体の活性を抑制することが可能になる。現在インヒビター保有患者の治療、特に重篤な出血もしくは手術時などには血中に存在するインヒビターを中和し、更に止血レベルに達するために大量のFVIII製剤の投与が行われている。この治療ではインヒビター抗体の上昇を招き、止血効果の低下が起きたり、出血傾向を起こしたりする場合が知られている。抗イディオタイプ抗体では、ヒト型抗体であるため抗原性は低く、  
15 また特異的であるため副作用の危険性は少ない。

また、インヒビター抗体除去に用いられているプロテインA固定化カラムに変わり、このような抗イディオタイプ抗体固定化カラムを用いれば特異的なインヒビター抗体の除去が可能になる。  
20

また、更に本発明のヒト型モノクローナル抗体及び抗体フラグメント分子の可変部位のペプチド、特に相補性決定領域（CDR）のペプチドあるいはそのペプチドで修飾した高分子キャリアーを用いてインヒビター抗体の抗イディオタイプ抗体産生を誘導する新たな免疫寛容療法薬を提供する。既に、インヒビター保有患者に対するFVIII製剤を用いた免疫寛容療法の試みが行われている。これは非出血時にFVIII製剤を繰り返し定期投与して、そのインヒビター力価を低下もしくは消失させる方法である。しかし、この方法は100～200単位/kgのFVIII製剤を1日2回連日投与したり、25単位/kgを隔日長期間にわたって投与するため、極めて高価であると共に、出血傾向の増大やアナフィラキシー等の  
25

危険性があり、また比較的低いインヒビター保有患者しか対象にできないなど課題が多い。

また、特許公報第 2 8 3 8 1 6 6 号では、FVIII抗原成分と主に患者の血漿中から得られたFVIII阻害剤成分からなる免疫複合体を用いた阻害剤産生の抑制のための医薬組成物及び方法を開示している。しかし、使用する抗FVIIIインヒビター抗体は基本的に患者等のヒト血漿成分から調製したものであり、その成分の調製に多大な労力を必要とすると共に、品質の均一性を保つことが困難である。また、インヒビターを保有する患者の血漿中には免疫複合体が多数存在する症例が報告されているため、腎臓への複合体の沈着増強と副作用を考慮しなければならない。

これに対し、本発明のヒト型モノクローナル抗体及び抗体フラグメント分子の可変部位のペプチド特に相補性決定領域（CDR）のペプチドあるいはそのペプチドで修飾した高分子キャリアーを用いてインヒビター抗体の抗イディオタイプ抗体産生を誘導する場合は、通常のワクチン接種に準じた取り組みが可能と考えられる。

本発明のヒト型モノクローナル抗体及び抗体フラグメント分子と同様の特異性、反応性を有するインヒビター保有患者の場合には同様のイディオタイプを持つと考えられる。

また、発明者等は、開示した抗体可変領域の中でも、特にH鎖のCDR 3領域とL鎖のCDR 3の領域がインヒビター抗体とFVIIIの結合の安定化に重要であることを見いだしている。従って、これらのCDRペプチドを患者に免疫して、抗イディオタイプ抗体産生を誘導できれば、血中のインヒビター抗体の働きを抑制することが可能になると考えられる。また、この方法は、インヒビター抗体の特に相補性決定領域に対する抗イディオタイプ抗体産生を誘導しようとするものであるが、生成した抗イディオタイプ抗体によりインヒビター抗体産生B細胞に対してアポトーシスを誘導する可能性も示唆されており、極めて特異的かつ、出血傾向の増大等のリスクを伴わない安全な治療法を提供することが可能になる。

以上のように本発明のヒト型モノクローナル抗体は、血液凝固第VIII因子の凝固活性を中和でき、血栓症の予防及び治療のための薬剤として使用することがで

きる。特に本発明のヒト型モノクローナル抗体は血液凝固第VIII因子-フォンビルブランド因子複合体を認識せず、フォンビルブランド因子に結合していない血液凝固第VIII因子のみを認識する。従って、血中半減期が非常に長く、出血を起こしにくい優れた効果が期待できる上、APTT測定などにより効果をモニター

5 できる優れた新規抗血栓剤となる。

また、本抗体を用いて血中の活性化した第VIII因子の診断も可能になる。

更に、本発明のヒト型モノクローナル抗体を用いることにより抗原エпитープとなるペプチドの単離と血漿中の抗イデオタイプ抗体の単離が可能となる。得られるペプチドと抗イデオタイプ抗体は、中和もしくは免疫寛容の機構により、イン

10 ンヒビター抗体を生じた血友病患者の治療に有効であることが期待される。

また、更に本発明のヒト型モノクローナル抗体及び抗体フラグメント分子の可変部位のペプチド、特に相補性決定領域（CDR）のペプチドあるいはそのペプチドで修飾した高分子キャリアーを用いてインヒビター抗体の抗イデオタイプ抗体産生を誘導する新たな免疫寛容療法薬を提供する。

以下、実施例にそって本発明を更に詳細に説明するが、これら実施例は本発明の範囲を限定するものではない。

#### 《実施例1：血友病患者からのファージライブラリーの構築》

ファージライブラリーの構築は、J. D. Marks ら（J. Mol. Biol., 222: 581-597, 1991）により報告されている方法を参考に調製した。

抗FVIIIインヒビター抗体保有患者末梢血28mlよりFicollにてリンパ球を分離し、PBSで十分に洗浄後、ISOGEN（日本ジーン）で処理して、total RNAを調製した。このtotal RNAを3つに分割し、ヒトIgG、 $\kappa$ 鎖、 $\lambda$ 鎖の定常領域に特異的なプライマーを使用し、first strand cDNA synthesis kit

（Pharmacia bio tec）にて、それぞれのcDNAを作製した。このcDNAをテンプレートにして、Marksらが報告したのと同様にVHとJH及びV $\kappa$ とJ $\kappa$ 、V $\lambda$ とJ $\lambda$ の組合せで各ジーンファミリーに特異的なプライマーを用いて、それぞれの抗体V領域遺伝子をポリメラーゼチェーンリアクション（PCR）法にて増幅した。

更に、VHとV $\kappa$ 、及びVHとV $\lambda$ をリンカーDNAを用いて、アッセンブリ

ーPCR法により結合させ、一本鎖s c F v DNAを作製した。s c F v DNAは更にPCRを用いて、N o t I及びS f i I制限酵素部位を付加し、アガロースゲルで電気泳動後、精製した。精製したs c F v DNAは制限酵素S f i I (Takara) とN o t I (Takara) で消化後、phagemid pCANTAB5E

- 5 (pharmacia) にクローニングした。s c F v DNAを結合させたpCANTAB5EはVH-V $\kappa$ 、VH-V $\lambda$ 毎にエレクトロポレーションにより大腸菌TG1に導入した。形質転換したTG1の数から、VH-V $\kappa$ 、VH-V $\lambda$ はそれぞれ $1.03 \times 10^7$ 、 $4.85 \times 10^6$  クローンの多様性を有すると評価された。この形質転換したTG1から、M13KO7ヘルパーファージを用いてファージ抗体を発現し、患者由来s c F v 呈示ファージライブラリーを調製した。

《実施例2：スクリーニング》

スクリーニング用バッファー（4%スキムミルク、0.5%ウシ血清アルブミン、50  $\mu$ g/mLマウスIgG、0.1%Tween20、TBS）に溶かした10単位/mL血液凝固第VIII因子(クロスエイトM)を500  $\mu$ Lとスクリーニング用バッファーに溶かした0.5  $\mu$ g/mLビオチン化抗血液凝固第VIII因子モノクローナル抗体FVIII:C14-182（マウス、第VIII因子軽鎖認識）またはFVIII:C14-282（マウス、FVIII重鎖A2ドメイン認識）を500  $\mu$ Lとをプラスチック試験管（FALCON2058）に取り混合し、室温で30分反応させた。これに患者由来ヒト型抗体ファージライブラリー（一本鎖抗体提示ファージ液）を1mL加え、室温で1時間反応させたのち、更に4℃で一晩反応させた。

2%スキムミルク－0.05%Tween20－TBSで処理したアビジン結合磁性粒子（Perseptive）100  $\mu$ Lを上記のビオチン化抗FVIIIモノクローナル抗体：FVIII混液1mLに加え、15分間穏やかに転倒混和した。マグネチックラックを用いて、磁性粒子を集め、0.05%Tween20－TBSで8回洗浄し、更にトリス緩衝液で2回洗浄を行った。洗浄後の磁性粒子に、1mLのグリシン緩衝液を加え懸濁し、室温で10分放置し、一本鎖抗体提示ファージを溶出させた。溶出したファージは500  $\mu$ Lの1M Tris(hydroxymethyl)aminomethane－HCl（pH7.5）を加えて、pHを調整した後、対数増殖期の大腸菌TG1の培養液5mLを加え、37℃で1時間ゆっくり振盪してTG1に感染させた。感染後

のTG1は3000×g、5分で遠心して、上清を除き、200μLの2×YT培地で懸濁し、SOBAGプレートに播き、30℃のふ卵器中で一晚培養した。生じたコロニーは適量の2×YT培地を加えスクレイパー (Coastor) を使って懸濁、回収した。このTG1 500μLを、50mLの2×YTAG培地に植

え、ヘルパーファージを用いてレスキューし、スクリーニング後のファージライブラリーを調製した。血友病患者由来ファージライブラリーVH-Vκ、VH-Vλ、それぞれに対してスクリーニングを計3回行った。3回目のスクリーニング後に、SOBAGプレートから任意にクローンを抽出し、scFvの発現の確認及びFVIIIサンドイッチELISAによる特異性の確認と塩基配列の解析を行った。

#### 《実施例3：scFvの発現と回収》

可溶性scFvを大腸菌HB2151を用いて発現させ、大腸菌ペリプラズム画分より回収、粗精製した。更に精製が必要な場合はRPAS Purification Module (Pharmacia Biotech)を用いて、アフィニティ精製を行った。

精製したscFv蛋白の純度は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動と、scFv蛋白のC末端のE-Tagエピトープを標的にしたウェスタンブロッティングにより確認した。scFv蛋白精製品の蛋白濃度の決定には、Protein Assayキット (BIO-RAD) を用いた。

#### 《実施例4：スクリーニングFVIII ELISA》

分離したクローンのスクリーニングのためのELISAは以下のように行った。

FVIII軽鎖認識のFVIII:C14-182とFVIII重鎖A2ドメイン認識のFVIII:C14-282の抗原決定基の異なる2種類の抗FVIIIマウスモノクローナル抗体をELISAプレートに固定化してスクリーニングに用いた。5μg/mL抗FVIIIモノクローナル抗体FVIII:C14-182、またはFVIII:C14-282を100μL/well ELISAプレート (MAXISORP module (Nunc)) に入れ、プレートシーラー (三光純薬) でシールし、室温または4℃で一晩放置、抗体を固定化した。TBSで3回洗浄後、1%BSA、TBSを300μL/well ELISAプレートに入れ、室温で1時間静置し、ブロッキングを行った。10単位/mLの血液凝固第VIII因子液 (クロスエイトM1000 (日本赤十字社)) を100μL/well ELISA

Aプレートに入れ、プレートシーラーでシールし、37℃で2時間静置した。FVIII液を捨て、ELISAプレート洗浄液で5回洗った後、scFvもしくはscFv呈示ファージを含む試料液を100  $\mu$ L/well入れ、室温で一晩反応させた。試料液を捨て、洗浄液で5回洗った後、西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ標識2次抗体を100  $\mu$ L/well入れ、37℃で1時間反応させた。反応液を捨て、ELISAプレート洗浄液で5回洗った後、発色基質液（TMB Z-過酸化水素）を100  $\mu$ L/well入れ、遮光し、室温～37℃で5～10分発色させた。1規定硫酸を100  $\mu$ L/well入れて発色反応を停止させた後、Molecular Device マルチプレートオートリーダー-SPECTRA MAXで450 nmの吸光度を測定した。評価した99クローン全てが、FVIIIサンドイッチELISAによって、FVIII特異的であることが確認された。

#### 《実施例5：クローンの配列分析》

単離したコロニーのscFv遺伝子前後領域をPCRで増幅し、得られたPCR産物を、Pst IやKpn Iなどの3～5種類の制限酵素で分解し、アガロース電気泳動のバンドパターンから、コロニーを分類した。その結果、完全なscFv遺伝子を保持した13クローンが同定された。これらのクローンのVH及びVLのDNA塩基配列をDye terminator cycle sequencing FS Ready Reaction kit (Applied Biosystems)を用いて決定した。

#### 《実施例6：単離したヒト型抗血液凝固第VIII因子一本鎖抗体の評価》

精製scFvを用いて、FVIII ELISAと抗凝固活性試験を行った結果、7種類が、FVIIIに特異に結合することが確認できた。そのうちの3種類に、FVIIIの凝固活性を阻害することが見いだされた。この3種のクローン YK3.3.38、YK3.3.40、YK3.3.50について、詳細な検討を行った。

抗FVIIIモノクローナル抗体FVIII:C14-182、またはFVIII:C14-282固定化プレート (MAXISORP module (Nunc)) に0.001～10単位/mLに調製したFVIII液（クロスエイトM1000（日本赤十字社））を100  $\mu$ L/well ELISAプレートに入れ、プレートシーラーでシールし、37℃で2時間静置した。FVIII液を吸引除去して洗浄液で5回洗浄後、scFv溶液を100  $\mu$ L/well 添加し、室温で一晩反応させた。試料液を吸引除去して洗浄液で5回洗浄後、西

洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ標識抗E t a g抗体を100  $\mu$  L/well入れ、37℃で1時間反応させた。試料液を吸引除去して洗浄液で5回洗浄後、発色基質液（TMBZ-過酸化水素）を100  $\mu$  L/well入れ、遮光し、室温～37℃で10分発色させた。1規定硫酸を100  $\mu$  L/well入れて発色反応を停止させた後、

5 Molecular Device マルチプレートオートリーダーSPECTRA MAXで450 nmの吸光度を測定した。YK3.3.38 scFvを用いた場合の結果を図1に示す。FVIIIを0.01単位/ml以上の高感度で検出、測定できることが示された。FVIIIの血中濃度は、出血傾向が強い状況下でも0.01単位/ml以上と報告されていることから、この測定系は血中の活性化FVIIIのモニタリングに十分な感度を有していた。

10

#### 《実施例7：抗凝固活性試験》

単離したヒト型抗血液凝固第VIII因子一本鎖抗体の評価は、テストチームFVIIIキット（第一化学薬品）とFVIII欠乏血漿（DADE）を用いた部分活性化トロンボプラスチン時間（APTT）の測定によって行った。

15 テストチームFVIIIキットの反応は添付の説明書の操作法Aエンドポイント法のとおりであるが、96ウェルマイクロプレートで測定できるようにスケールを1/4に縮小した。

部分活性化トロンボプラスチン時間（APTT）の測定には、Fibrintimer（Behring）を用い、以下の文献の方法に従った：National Committee for

20 Clinical Laboratory Standards. Collection, transport and processing of blood specimens for coagulation testing and performance of coagulation assays. 2nd Edition. Approved Guideline. NCCLS Publication H21-A2. Villanova, PA. 1991. ; Sirridge, M. S. ; Shannon, R. Laboratory Evaluation of Hemostasis and Thrombosis, 3rd Ed., Philadelphia: Lea and Febinger,

25 1983: 130-133。

抗原抗体反応は、抗体試料希釈液と1単位/ml FVIII液（クロスエイトM）とを等量混合し、37℃で2時間以上反応させた。その後、テストチームFVIIIキットまたは部分活性化トロンボプラスチン時間（APTT）の測定を行った。

テストチームFVIIIキットによる測定成績を図2に示す。いずれのクローンも10 ng/ml以上の濃度でFVIII活性を強力に阻害することが示された。これは部分活性化トロンボプラスチン時間（APTT）でも同様の結果であった。

《実施例8：フォンビルブランド因子存在下における影響の検討》

- 5      上記実施例の抗原抗体反応において、ほとんどvWFを含まないFVIII（クロスエイトM、日本赤十字製）とマルチマーのvWFを含む精製FVIII（コンファクトF、財団法人 化学及血清療法研究所製）の両者を用いてvWFの存在の影響について比較検討した。部分活性化トロンボプラスチン時間（APTT）測定
- 10      によるYK3.3.38を用いた場合の成績を図3に示す。比較に市販のインヒビター患者血漿（GedrgKingMedical, Inc. lot. GK1833-929J2）を用いた。

これらの検討により、本発明の抗FVIII抗体クローンYK3.3.38、YK3.3.40、YK3.3.50は、vWFに結合したFVIIIを不活化せず、単独で存在するFVIIIを不活化することが明らかになった。



## 請求の範囲

1. ヒト血液凝固第VIII因子（以下、FVIIIと称することもある）の凝固活性を阻害する活性（インヒビター活性）を有するヒト抗FVIII抗体のVH鎖をコードする遺伝子断片。

5 2. 当該ヒト抗FVIII抗体がFVIIIーフォンビルブランド因子（以下、vWFと称することもある）複合体を認識せず、vWFに結合していないFVIIIのみを認識する抗体である請求項1に記載の遺伝子断片。

3. 当該VH鎖の相補性決定領域（CDR1～3）が下記のアミノ酸配列である請求項1または2に記載の遺伝子断片。

10 CDR1 : Glu Leu Ser Ile His <配列番号13>

CDR2 : Gly Leu Asp Arg Glu Asp Gly Lys Xaa Val Ser Ala Gln Arg Phe  
Gln Gly (Xaa : ThrまたはAla) <配列番号14>

CDR3 : Gly Val Ala Ser Asp Asp Asp Ala Phe Glu Ile <配列番号15>

15 4. 当該VH鎖が配列表配列番号2、6または10から選択されるアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる請求項1から3に記載の遺伝子断片。

5. ヒトFVIIIの凝固活性を阻害する活性（インヒビター活性）を有するヒト抗FVIII抗体のVL鎖をコードする遺伝子断片。

6. 当該ヒト抗FVIII抗体がFVIIIーフォンビルブランド因子（以下、vWFと称することもある）複合体を認識せず、vWFに結合していないFVIIIのみを  
20 認識する抗体である請求項5に記載の遺伝子断片。

7. 当該VL鎖の相補性決定領域（CDR1～3）が下記のアミノ酸配列である請求項5または6に記載の遺伝子断片。

CDR1 : Arg Ala Ser Gln Ser Ile Xa1 Xa2 Tyr Leu Asn (Xa1 : Serまたは  
Thr ; Xa2 : SerまたはArg) <配列番号16>

25 CDR2 : Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser <配列番号17>

CDR3 : Gln Xa1 Ser Tyr Xa2 Thr Pro Xa3 Thr (Xa1 : GlnまたはHis ; Xa2 :  
SerまたはThr ; Xa3 : LeuまたはIle) <配列番号18>

8. 当該VL鎖が配列表配列番号4、8または12から選択されるアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる請求項5から7に記載の遺伝子断片。

9. 請求項1から4のいずれかに記載のVH鎖遺伝子及び請求項5から8のいずれかに記載のVL鎖遺伝子を結合してなる一本鎖Fv（以下、scFvと称することもある）遺伝子。

10. 請求項1から4のいずれかに記載のVH鎖遺伝子及び請求項5から8のいずれかに記載のVL鎖遺伝子を、それぞれヒト抗体CH鎖遺伝子及びヒト抗体CL鎖遺伝子と結合してなるヒト抗FVIII抗体をコードする遺伝子断片。

11. 請求項1から4のいずれかに記載のVH鎖遺伝子及び／または請求項5から8のいずれかに記載のVL鎖遺伝子を、それぞれヒト抗体CH鎖遺伝子またはその一部及びヒト抗体CL鎖遺伝子またはその一部と結合してなるヒト型抗FVIII抗体フラグメントをコードする遺伝子断片。

12. 当該抗体フラグメントが、Fab、Fab'、またはF(ab')<sub>2</sub>から選ばれる請求項11に記載の遺伝子断片。

13. 請求項9に記載の一本鎖Fv遺伝子を、ヒト抗体CH鎖遺伝子またはその一部、またはヒト抗体CL鎖遺伝子またはその一部と結合してなるヒト型抗FVIII抗体フラグメントをコードする遺伝子断片。

14. 請求項1から13のいずれかに記載の遺伝子断片を発現ベクターに組み込み、遺伝子組換え法により発現されるヒト抗FVIII抗体またはヒト型抗FVIII抗体フラグメント。

15. 請求項14に記載のヒト抗FVIII抗体またはヒト型抗体フラグメントを用いた血栓症予防・治療薬。

16. 請求項14に記載のヒト抗FVIII抗体またはヒト型FVIII抗体フラグメントを用いた活性化FVIII診断薬。

17. 血友病A患者リンパ球由来の免疫グロブリンのVH鎖遺伝子とVL鎖遺伝子のランダムな組み合わせによるscFv DNAを用いて作製されたscFvディスプレイファージライブラリーを、抗FVIIIモノクローナル抗体を介して固相に固定化されたFVIIIと反応させて、FVIIIと結合可能なscFvクローンを分離することからなる抗FVIII-scFvディスプレイファージクローンのスクリーニング法。

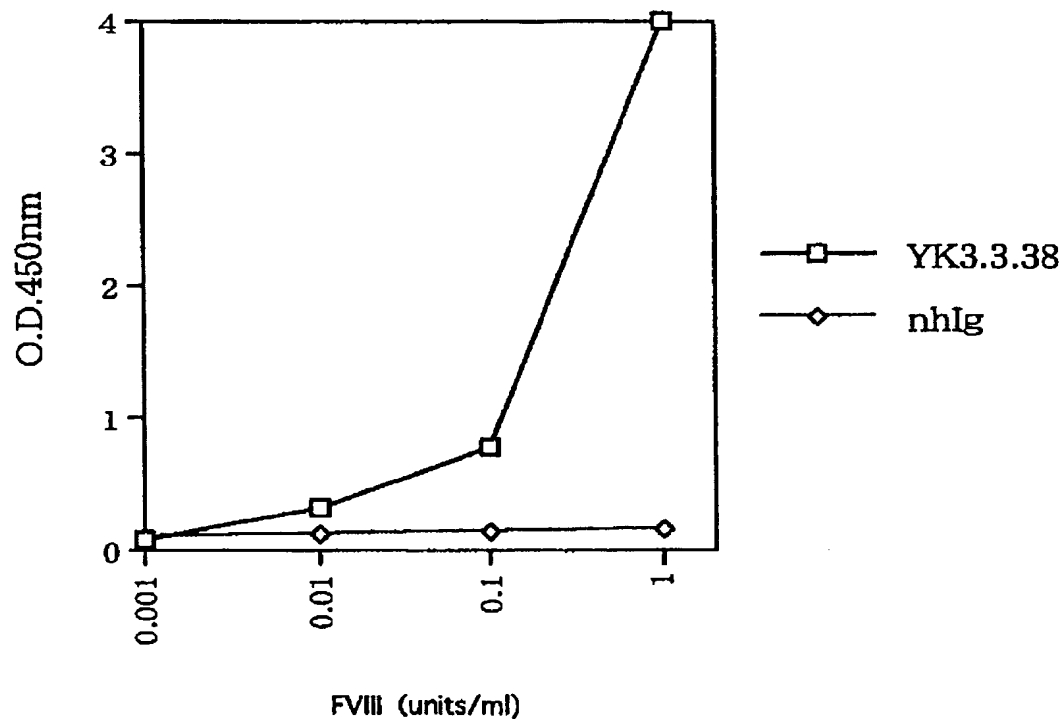
18. 当該抗FVIIIモノクローナル抗体がマウスモノクローナル抗体である請

求項 17 に記載のスクリーニング法。

19. 当該抗FVIIIモノクローナル抗体がFVIIIのA2領域もしくは活性化FVIII L鎖を認識する抗体である請求項 17 または 18 に記載のスクリーニング法。

- 5 20. 当該抗FVIIIモノクローナル抗体がビオチン化抗体であり、固相がアビジン固定化磁性粒子である請求項 17 から 19 のいずれかに記載のスクリーニング法。

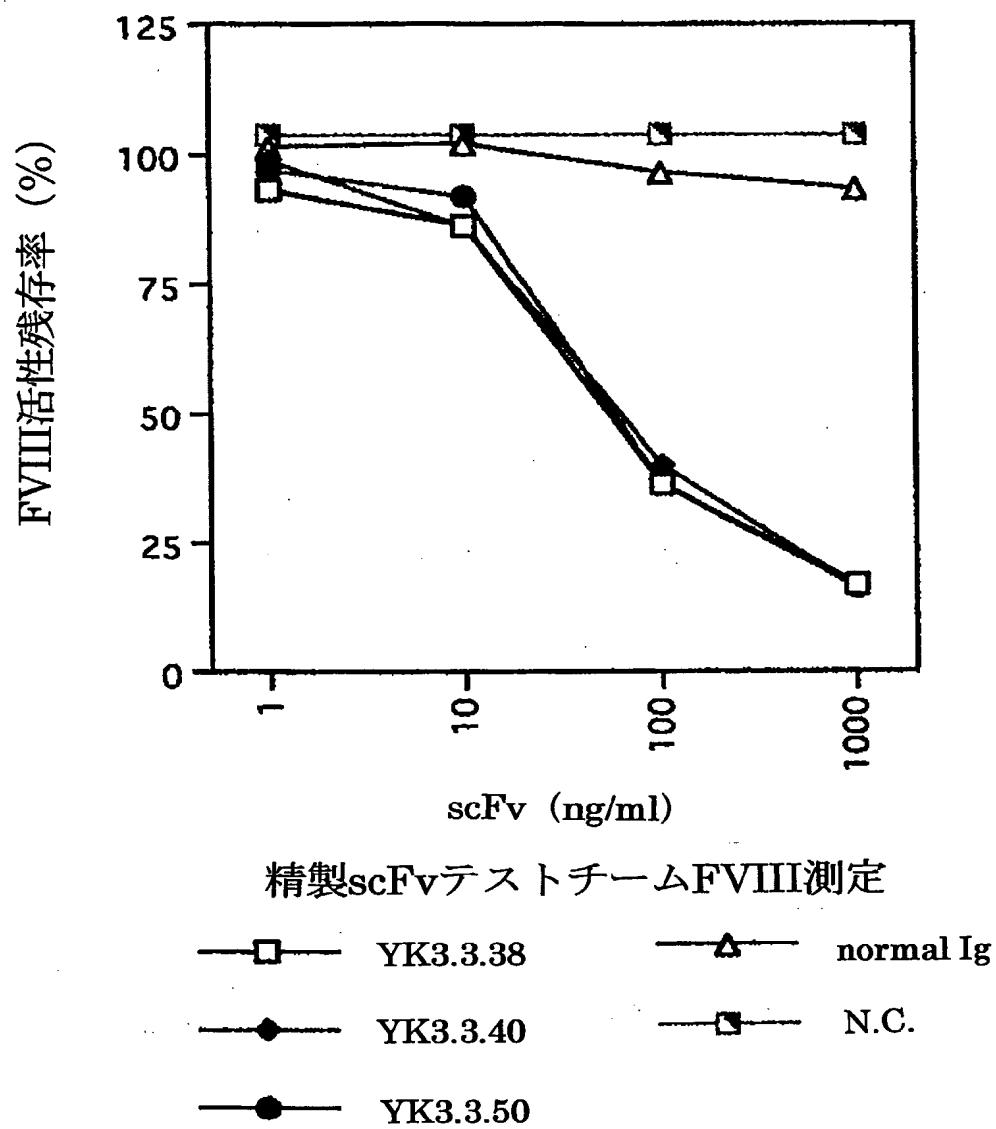
図 1



FVIII測定ELISA

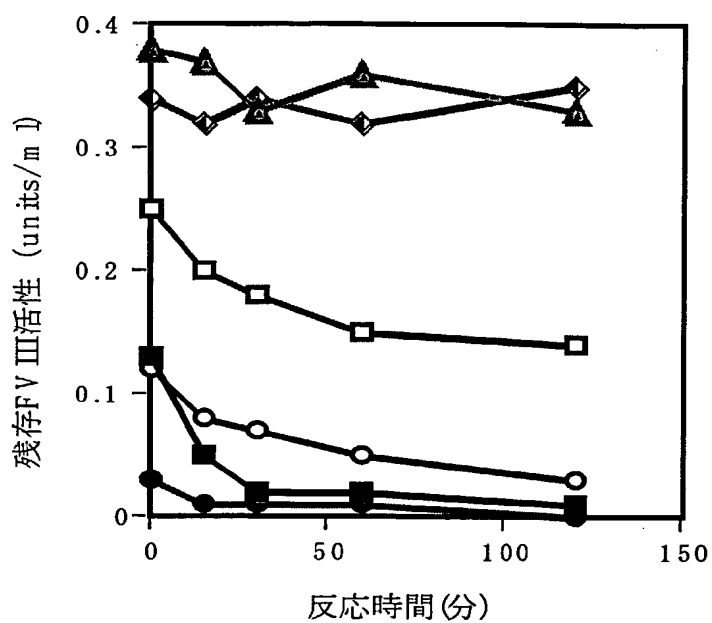
2/3

図 2



3/3

図 3



## vW F存在の影響

- YK 3.3.38 scFv 0.1  $\mu$ g/ml 添加/vW F非存在下
- YK 3.3.38 scFv 0.1  $\mu$ g/ml 添加/vW F存在下
- 患者plasma由来インヒビター抗体/vW F非存在下
- 患者plasma由来インヒビター抗体/vW F存在下
- ▲— vW F非存在下
- ◇— vW F存在下

1/13

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Juridical Foundation The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute

&lt;120&gt; Human-typed antibody against blood coagulation factor VIII

&lt;130&gt; 663248

&lt;150&gt; JP 2001-177640

&lt;151&gt; 2001-06-12

&lt;160&gt; 18

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 360

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 1

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
tcctgcaagg tgtccggata caccctcact gaattatcca tccactgggt gcgacaggct	120
cctgaaaaag ggcttgagtg gataggaggt cttgatcgtg aagacgggaa aacagtctcc	180
gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca caccacaga cacaacctac	240
atgcaactga ccagcctgtc atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aacaggtgtt	300
gcttccgatg acgatgcttt tgagatctgg ggccaaggga caacggtcac cgtctcttca	360

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

2/13

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 2

cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc  
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15  
tca gtg aag gtc tcc tgc aag gtg tcc gga tac acc ctc act gaa tta  
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu  
20 25 30  
tcc atc cac tgg gtg cga cag gct cct gaa aaa ggg ctt gag tgg ata  
Ser Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45  
gga ggt ctt gat cgt gaa gac ggg aaa aca gtc tcc gca cag agg ttc  
Gly Gly Leu Asp Arg Glu Asp Gly Lys Thr Val Ser Ala Gln Arg Phe  
50 55 60  
cag ggc aga gtc acc atg acc gag gac aca ccc aca gac aca acc tac  
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Pro Thr Asp Thr Thr Tyr  
65 70 75 80  
atg caa ctg acc agc ctg tca tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt  
Met Gln Leu Thr Ser Leu Ser Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
gca aca ggt gtt gct tcc gat gac gat gct ttt gag atc tgg ggc caa  
Ala Thr Gly Val Ala Ser Asp Asp Asp Ala Phe Glu Ile Trp Gly Gln  
100 105 110  
ggg aca acg gtc acc gtc tct tca  
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120



3/13

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 324

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 3

```

gacatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgctcac tttcggcgga      300
gggaccaagg tggagatcaa acgt                                           324

```

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 4

```

gac atc cag ttg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1             5             10             15
gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc agc tat
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
          20             25             30
tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35             40             45

```

4/13

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

gaa gat ttt gca act tac tac tgt caa cag agt tac agt acc ccg ctc  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu

85

90

95

act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa cgt

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100

105

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 360

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 5

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggggttgag gtgaagaagt ctggggcctc agtgaaggtc 60  
 tcctgcaagg tgtccggata caccctcact gaattatcca tccactgggt gcgacaggct 120  
 cctgaaaaag ggcttgagtg gataggaggt cttgatcgtg aagacgggaa agcagtcctcc 180  
 gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catccacaga cacaacctac 240  
 atgcaactga ccagcctgtc atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aacaggtgtt 300  
 gcttccgatg acgatgcttt tgaaatctgg ggccaaggga caatggtcac cgtctcttca 360

&lt;210&gt; 6

5/13

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 6

gag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gtt gag gtg aag aag tct ggg gcc

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Ser Gly Ala

1 5 10 15

tca gtg aag gtc tcc tgc aag gtg tcc gga tac acc ctc act gaa tta

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu

20 25 30

tcc atc cac tgg gtg cga cag gct cct gaa aaa ggg ctt gag tgg ata

Ser Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

gga ggt ctt gat cgt gaa gac ggg aaa gca gtc tcc gca cag agg ttc

Gly Gly Leu Asp Arg Glu Asp Gly Lys Ala Val Ser Ala Gln Arg Phe

50 55 60

cag ggc aga gtc acc atg acc gag gac aca tcc aca gac aca acc tac

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Thr Tyr

65 70 75 80

atg caa ctg acc agc ctg tca tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt

Met Gln Leu Thr Ser Leu Ser Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

gca aca ggt gtt gct tcc gat gac gat gct ttt gaa atc tgg ggc caa

Ala Thr Gly Val Ala Ser Asp Asp Asp Ala Phe Glu Ile Trp Gly Gln

100 105 110

ggg aca atg gtc acc gtc tct tca

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

6/13

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 324

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 7

```

gacatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc    60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca    120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca    180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct    240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgatcac cttcggccaa    300
gggacacgac tggagattaa acgt                                           324

```

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 8

```

gac atc cag ttg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1             5             10             15
gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc agc tat
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
          20             25             30
tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc

```

7/13

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

gaa gat ttt gca act tac tac tgt caa cag agt tac agt acc ccg atc

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Ile

85

90

95

acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa cgt

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 360

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 9

caggtgcagc tgggtgcagtc tgggggttgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcttgcaagg tgtccggata caccctcact gaattatcca tccactgggt gcgacaggct 120

cctgaaaaag ggcttgagtg gataggaggt cttgatcgtg aagacgggaa aacagtctcc 180

gcacagaggt tccagggcag agtcacatg accgaggaca catccacaga cacaacctac 240

atgcaactga ccagcctgtc atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aacagggtgtt 300

gcttccgatg acgatgcttt tgaaatctgg ggccaaggga ccacgggtcac cgtctcctca 360

8/13

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 10

cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gtt gag gtg aag aag cct ggg gcc  
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

tca gtg aag gtc tcc tgc aag gtg tcc gga tac acc ctc act gaa tta  
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu

20 25 30

tcc atc cac tgg gtg cga cag gct cct gaa aaa ggg ctt gag tgg ata  
Ser Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

gga ggt ctt gat cgt gaa gac ggg aaa aca gtc tcc gca cag agg ttc  
Gly Gly Leu Asp Arg Glu Asp Gly Lys Thr Val Ser Ala Gln Arg Phe

50 55 60

cag ggc aga gtc acc atg acc gag gac aca tcc aca gac aca acc tac  
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Thr Tyr

65 70 75 80

atg caa ctg acc agc ctg tca tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt  
Met Gln Leu Thr Ser Leu Ser Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

gca aca ggt gtt gct tcc gat gac gat gct ttt gaa atc tgg ggc caa  
Ala Thr Gly Val Ala Ser Asp Asp Asp Ala Phe Glu Ile Trp Gly Gln

100 105 110

ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca

9/13

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 324

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 11

```

gacatcgtga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc    60
atcacatgcc gggcaagtca gtccattacc agatatttaa attggtatca gcagaaacca    120
gggaaagccc ctaaactcct gatctttgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca    180
cggttcagtg gcagtggatc tgggacagaa ttactetca ccatcagcag tctgcaacct    240
gaggattttg cgacttacta ctgtcaacac agttacacta ccccgctcac tttcggcgga    300
gggaccaaag tggatatcaa acgt                                           324

```

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 12

```

gac atc gtg atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1             5             10             15
gac aga gtc acc atc aca tgc cgg gca agt cag tcc att acc aga tat
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Thr Arg Tyr

```

10/13

20	25	30	
tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aaa ctc ctg atc			
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
35	40	45	
ttt gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca cgg ttc agt ggc			
Phe Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
agt gga tct ggg aca gaa ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct			
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
gag gat ttt gcg act tac tac tgt caa cac agt tac act acc ccg ctc			
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Tyr Thr Thr Pro Leu			
85	90	95	
act ttc ggc gga ggg acc aaa gtg gat atc aaa cgt			
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg			
100	105		

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR1 of SEQUENCE No. 2, 6 or 10

&lt;400&gt; 13

Glu Leu Ser Ile His



11/13

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR2 of SEQUENCE No. 2, 6 or 10

&lt;223&gt; Xaa represents Thr or Ala.

&lt;400&gt; 14

Gly Leu Asp Arg Glu Asp Gly Lys Xaa Val Ser Ala Gln Arg Phe Gln

1 5 10 15

Gly

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR3 of SEQUENCE No. 2, 6 or 10

&lt;400&gt; 15

Gly Val Ala Ser Asp Asp Asp Ala Phe Glu Ile

1 5 10

12/13

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR1 of SEQUENCE No. 4, 8 or 12

&lt;223&gt; Xa1 represents Ser or Thr.

&lt;223&gt; Xa2 represents Ser or Arg.

&lt;400&gt; 16

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Xa1 Xa2 Tyr Leu Asn

1

5

10

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR2 of SEQUENCE No. 4, 8 or 12

&lt;400&gt; 17

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1

5

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 9

13/13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR3 of SEQUENCE No. 4, 8 or 12

&lt;223&gt; Xa1 represents Gln or His.

&lt;223&gt; Xa2 represents Ser or Thr.

&lt;223&gt; Xa3 represents Leu or Ile.

&lt;400&gt; 18

Gln Xa1 Ser Tyr Xa2 Thr Pro Xa3 Thr

1

5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/05783

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K16/14, 7/06, 7/08, C12P21/08, G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K16/14, 7/06, 7/08, C12P21/08, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GeneBank/EMBL/DBJ/SwissProt/PIR/GeneSeq,  
CA/BIOSIS/WPIDS/MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	WO 01/04269 A1 (JACQUEMIN, Marc, G.), 18 January, 2001 (18.01.01), Claims; examples & AU 200062730 A & EP 1194528 A1	<u>1, 5, 9</u> 1-20
<u>X</u> Y	Edward N. van den Brink et al., "Multiple VH genes are used to assemble human antibodies directed toward the A3-C1 domains of factor VIII" Blood, 2001, Vol.97, No.4, pages 966 to 972	<u>1, 5, 9, 17-20</u> 1-20
<u>X</u> Y	Edward N. van den Brink et al., " Human antibodies with specificity for the C2 domain of factor VIII are derived from VH1 germline genes" Blood, 2000, Vol.95, No.2, pages 558 to 563	<u>1, 5, 9, 17-20</u> 1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance"E" earlier document but published on or after the international filing  
date"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means"P" document published prior to the international filing date but later  
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
22 August, 2002 (22.08.02)Date of mailing of the international search report  
03 September, 2002 (03.09.02)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/05783

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	Edward N. van den Brink et al., "Molecular analysis of human anti-factor VIII antibodies by V gene phage display identifies a new epitope in the acidic region following the A2 domain" Blood, 2000, Vol.96, No.2, pages 540 to 545	<u>1,5,9,17-20</u> 1-20
A	Kimberly D. Victor et al., " Human monoclonal striational autoantibodies isolated from thymic B lymphocytes of patients with myasthenia gravis use VH and VL gene segments associated with the autoimmune repertoire" Eur. J. Immunol., 1992, Vol.22, pages 2231 to 2236	7-8
P,A	WO 01/62907 A1 (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.), 30 August, 2001 (30.08.01), Claims; examples & AU 200134125 A	1-20

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K16/14, 7/06, 7/08, C12P21/08, G01N33/53

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K16/14, 7/06, 7/08, C12P21/08, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GeneBank/EMBL/DBJ/SwissProt/PIR/GeneSeq, CA/BIOSIS/WPIDS/MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	WO 01/04269 A1 (JACQUEMIN, Marc, G.) 2001.01.18, 特許請求の範囲、実施例等参照, & AU 200062730 A & EP 1194528 A1	<u>1, 5, 9</u> 1-20
<u>X</u> Y	Edward N. van den Brink et al. "Multiple VH genes are used to assemble human antibodies directed toward the A3-C1 domains of factor VIII" Blood, 2001, Vol. 97, No. 4, p. 966-972	<u>1, 5, 9, 17-20</u> 1-20
<u>X</u> Y	Edward N. van den Brink et al. "Human antibodies with specificity for the C2 domain of factor VIII are derived from VH1 germline genes" Blood, 2000, Vol. 95, No. 2, p. 558-563	<u>1, 5, 9, 17-20</u> 1-20

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.08.02

国際調査報告の発送日

2003.09.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂崎 恵美子



4N

9451

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> <u>Y</u>	Edward N. van den Brink et al. "Molecular analysis of human anti-factor VIII antibodies by V gene phage display identifies a new epitope in the acidic region following the A2 domain" Blood, 2000, Vol.96, No.2, p.540-545	<u>1, 5, 9, 17-20</u> 1-20
A	Kimberly D. Victor et al. "Human monoclonal striational autoantibodies isolated from thymic B lymphocytes of patients with myasthenia gravis use VH and VL gene segments associated with the autoimmune repertoire" Eur. J. Immunol., 1992, Vol.22, p.2231-2236	7-8
P, A	WO 01/62907 A1 (株式会社 医学生物学研究所) 2001.08.30, 特許請求の範囲、実施例等参照, & AU 200134125 A	1-20